



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

---

**TRATAMENTO COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES  
COM PARESIA COMO SEQUELA NEUROLÓGICA DA INFECÇÃO  
PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

Cristiane Nascimento Dantas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Mortari

BRASÍLIA - DF  
JUNHO/2019



**CRISTIANE NASCIMENTO DANTAS**

**TRATAMENTO COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM CÃES  
COM PARESIA COMO SEQUELA NEUROLÓGICA DA INFECÇÃO  
PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação em Medicina Veterinária  
apresentado junto à Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup>. Ana Carolina Mortari

BRASÍLIA - DF  
JUNHO/2019

Dantas, Cristiane Nascimento

Tratamento com Células Tronco Mesenquimais em Cães com Paresia como Sequelas Neurológicas da Infecção pelo Vírus Cinomose/ Cristiane Nascimento Dantas; orientação de Ana Carolina Mortari - Brasília, 2019.

45 PAGINAS .: il

Trabalho de conclusão de curso de graduação - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Nome do Autor: Cristiane Nascimento Dantas

Título do Trabalho: Tratamento com Células Tronco Mesenquimais em Cães com Paresia como Sequelas Neurológicas da Infecção pelo Vírus Cinomose

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Cristiane Nascimento Dantas

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do autor: DANTAS, Cristiane Nascimento

Título: Tratamento com Células Tronco Mesenquimais em Animais com Sequelas Neurológicas de Cinomose

Trabalho de conclusão do curso de  
graduação em Medicina Veterinária  
apresentado junto à Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

Aprovado em 09/07/19

Banca Examinadora

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Mortari

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: aprovada

Assinatura: 

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Furtado Malard

Instituição: Bio Cell

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Dr<sup>a</sup>. Tatiana S. Dourado

Instituição: Intensivet

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

## AGRADECIMENTO

É chegado ao fim um longo ciclo de muitas risadas, choros, noites viradas, frustrações e alegrias. E agradeço primeiramente a Deus, por me guiar sempre nessa jornada, e me permitir passar por momentos maravilhosos de crescimento dentro e fora da vida acadêmica. E por ter colocado todos os filhos de quatro patas na minha vida, que me inspiram e me dão motivação diária pra seguir esse caminho.

Aos meus pais, Duque e Vera, que sempre apoiaram e investiram em todas as minhas decisões pra tornar meu sonho de criança uma realidade. Por sempre falar com muito orgulho que tem uma médica veterinária em casa, e incentivar todas as minhas "loucuras" dentro da veterinária. Obrigada por acreditarem no meu potencial, e principalmente, na minha profissão. À minha irmã Camila, que compartilha comigo o prazer que é trabalhar na área da saúde.

A todos os professores que passaram pela minha vida, sem eles eu não teria chegado até aqui. Em especial às professoras Simone Perecmanis e Lígia Cantarino, por estarem sempre à disposição de resolver os problemas mais impossíveis, e de maneira tão dedicada e amorosa. E à minha professora e orientadora, tão querida, Ana Carolina. Obrigada pela paciência, dedicação, conselhos e respostas constantes por mensagem. Por estar sempre a disposição e por ter compartilhado tanto conhecimento nesse processo.

Às minhas amigas Isabela Simas e Marina Dolbeth, presentes que a medicina veterinária me deu, e que eu carrego para o resto da vida. Ao Alexandre Monteiro e Luana Maia, que estiveram ao meu lado durante o desespero antes e depois de provas, por acreditarem em mim, e ter dividido o tempo com os estudos. À Lígia Sarneiro, que compartilhou comigo a melhor fase da minha vida durante o programa Ciências sem Fronteiras, sem você não teria sido a mesma coisa.

A todos os funcionários do laboratório BioCell, por estarem sempre a disposição de ensinar e ajudar, além de terem participado da criação desse projeto.

Por fim, agradeço a todos que passaram por mim e fizeram parte da minha formação acadêmica.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução	1
1.1 Cinomose	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Aspectos Clínicos	2
1.4 Sinais Clínicos Neurológicos	4
1.5 Diagnóstico	7
1.6 Tratamento	8
1.7 Células-Tronco Mesenquimais	10
2. Objetivo	11
3. Materiais e Métodos	11
4. Resultados	14
5. Discussão	25
6. Conclusão	30
7. Referências	31

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

CDV	Vírus da Cinomose Canina ( <i>Canine Distemper Virus</i> )
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
Kg	Quilogramas
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M0	Momento inicial do tratamento
M1	Momento após primeira aplicao
M2	Momento após segunda aplicao
M3	Momento após terceira aplicao
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MTs	Membros Torácicos
MTE	Membro Torácico Esquerdo
MTD	Membro Torácico Direito
MPs	Membros Pélvicos
MPE	Membro Pélvico Esquerdo
MPD	Membro Pélvico Direito
ODE	<i>Old Dog Encephalitis</i>
PPC	Propriocepo consciente
PPE	Paraparesia espástica
PPF	Paraparesia flácida
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TPE	Tetraparesia Espástica
TPF	Tetraparesia flácida
%	Porcentagem
µg	Microgramas

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - André em M0. Tetraparesia espástica com ausência de propriocepção consciente. _____	28
FIGURA 2 - André 4 meses após o fim do tratamento apresentando recuperação total. _____	28
FIGURA 3 - Spyke em M0. Paraparesia espástica com impotência funcional de membro torácico direito. _____	29
FIGURA 4 - Spyke um mês após o fim do tratamento, apresentando melhora dos membros pélvicos e membro torácico esquerdo, porém impotência funcional de MTD . _____	30



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Identificação dos pacientes e classificação de acordo com grau da lesão neurológica avaliada em M0	15
TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães	16
TABELA 3 - Sequelas neurológicas mais frequentes no estudo em M0	23
TABELA 4 - Desenvolvimento das sequelas neurológicas mais frequentes no estudo em M3	24

## RESUMO

A cinomose é caracterizada por sintomas respiratórios, gastrointestinais e neurológicos, podendo gerar graves sequelas. O presente estudo avaliou o tratamento com células-tronco mesenquimais em cães com sequelas pelo vírus da cinomose afetando a locomoção (paresias). Foram avaliados nove cães que apresentavam paraparesia ou tetraparesia como sequela neurológica da cinomose. Foi possível concluir que todos os pacientes apresentaram algum tipo de melhora no quadro clínico. Apenas 22,2% (n=2) dos cães não demonstraram evolução em relação à locomoção, onde apresentaram tetraparesia tanto na avaliação neurológica inicial (M0) quanto na avaliação final (M3). 44,4% (n=4) dos cães apresentaram melhora total, sendo que 75% (n=3) destes apresentaram tetraparesia em M0 e postura normal em M3, e 25% (n=1) apresentou paraparesia em M0 e postura normal em M3. Os outros 33,3% (n=3) apresentaram melhora parcial, sendo que 33,3% (n=1) destes apresentou tetraparesia em M0 e paraparesia em M3, e 66,7% (n=2) apresentaram paraparesia em M0 e paresia de apenas um membro em M3. O presente estudo demonstrou que durante o tratamento todos os cães apresentaram alguma melhora do quadro neurológico, evidenciando o potencial do uso de células-tronco mesenquimais no tratamento para sequelas neurológicas da cinomose canina.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, cinomose, sequela neurológica, paresia.

## ABSTRACT

Distemper is characterised by respiratory, gastrointestinal and neurological signs that can lead to severe sequels. In this study we evaluated the treatment with mesenchymal stem cell in with locomotion sequels (paresis) due to infection by the canine distemper virus. We evaluated nine dogs that presented paraparesis or tetraparesis as a neurological sequel of distemper. We concluded that all patients presented some type of improvement in the clinical conditions. Only 22,2% (n=2) of the dogs did not show locomotion improvement, presenting tetraparesis in both the inicial neurological evaluation (M0) and the final evaluation (M3). 44,4% (n=4) recovered completely, being that 75% (n=3) presented tetraparesis at M0 and normal stance at M3, and 25% (n=1) presentes paraparesis at M0 and normal stance at M3. The other 33,3% (n=3) showed partial improvement, being that 33,3% (n=1) presented tetraparesis at M0 and paraparesis at M3, and 66,7% (n=2) presentes paraparesis at M0 and paresis of only one limb at M3. This study demonstrated that during the treatment all of the dogs presented some type of improvement in the neurological evaluation, showing the potencial of the use of mesenchymal stem cells in the treatment of neurological sequel of canine distemper.

**Keywords:** mesenquimal stem cells, distemper, neurological sequels, paresis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1. 1 Cinomose

A cinomose é uma doença causada pelo Vírus da Cinomose Canina (CDV, *canine distemper virus*), que pertence ao gênero *Morbilivirus* e à família *Paramyxoviridae*. O CDV é caracterizado por apresentar RNA com fita helicoidal de sentido negativo, e possuir envelope de lipoproteína. Essas características fazem com que o vírus induza a fusão celular e citólise imunomediada das células infectadas. Ao mesmo tempo, interfere na produção de citocinas, o que acarreta a imunossupressão do animal (GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015; PRATAKPIRIYA et al, 2017).

A severidade da doença é diferenciada pelas cepas do patógeno, pois essas tem tropismo e potenciais distintos para provocar a doença, podendo causar desde desmielinização até encefalomielite severas (GREENE, 2011). O vírus tem tropismo por tecidos linfóide, nervoso e epitelial, sendo esses os principais alvos da replicação viral. A excreção ocorre principalmente através de exsudatos respiratório e conjuntival, além de fezes, urina e saliva, podendo ser eliminados por até 90 dias após a infecção (NELSON e COUTO, 2015).

Em países tropicais, como o Brasil, a exposição do vírus ao ambiente pode torná-lo muito sensível. Devido à característica de ser protegido por uma cápsula lipoprotéica, ele é inativado pela luz ultravioleta e destruído por temperaturas elevadas (acima de 50°C por aproximadamente 30 minutos). No entanto, em regiões frias o efeito é inverso, pois quando acondicionado em temperaturas baixas o vírus preserva a estabilidade, podendo manter-se assim à temperatura de -65°C por até 7 semanas (GREENE, 2011; BORBA et al., 2002; LÚCIO et al., 2014; HEADLEY et al., 2012). A limpeza do ambiente com desinfetante à base de amônia, éter ou clorofórmio é capaz de acabar com o risco de infecção do CDV. A transmissão do vírus se dá através do contato direto entre animais doentes e sadios, podendo ser a partir da interação com gotículas

infectantes nas secreções corpóreas, fômites ou em ambiente nosocomial (MARTELLA et al., 2008; SILVA et al., 2009, FLORES, 2007).

## 1.2 Epidemiologia

Os cães domésticos são os principais reservatórios do vírus, porém guaxinins (*Procyon lotor*) e martas (*Martes spp*) desempenham o mesmo papel no meio silvestre. O CDV tem distribuição mundial e pode infectar outros animais, tais como panda-vermelho (*Ailurudes*), coiotes, furão, suricatas, felídeos, elefantes, golfinhos e focas (GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015; FLORES, 2007; HEADLEY e GRAÇA et al., 2000; HEADLEY et al., 2012; DEEM et al., 2000).

A manifestação clínica da cinomose, geralmente, aparece entre o nono e o décimo quarto dia pós infecção viral, sendo que em animais imunossuprimidos a replicação do vírus acontece de forma muito intensa no aparelho geniturinário e nos tratos respiratório e gastrointestinal, podendo levar o animal a óbito nessa fase. Já animais que apresentam resposta imunológica moderada, a replicação acontece principalmente no tecido epitelial. Cães devidamente imunizados e que apresentem resposta imune adequada para o vírus da cinomose não costumam apresentar a sintomatologia da doença, e eliminam o vírus até, em média, o 14º dia após a infecção (NELSON E COUTO, 2015; DEEM et al., 2000). Por ser uma doença infecciosa grave, possui índice de mortalidade muito alto, de 50% a 90%, ficando atrás apenas do vírus da raiva (Ettinger e Feldmano, 1995).

## 1.3 Aspectos Clínicos

Os sinais clínicos estão relacionados com a virulência da cepa infectante, condições ambientais, resposta imunológica, progressão da doença, idade do animal e local onde o vírus se instala (GREENE, 2011; NELSON E COUTO, 2015, FLORES, 2007; HEADLEY et al., 2012;). Quando o CDV invade o corpo do animal ele se espalha pelo organismo através de linfócitos e monócitos, causando um pico febril. O cão pode apresentar alterações no sistema respiratório (pneumonia secundária, secreção nasal), trato gastrointestinal (vômito, anorexia), lesões cutâneas (hiperqueratose em coxins e nariz),

oftalmológicas (conjuntivite) e neurológicas (mioclonia, ataxia, paresia), podendo acontecer concomitantemente, ou em etapas distintas (SILVA et al., 2009, FLORES, 2007).

Pode-se classificar a cinomose canina em três etapas progressivas, onde cada fase é caracterizada de acordo com alterações histopatológicas: aguda, subaguda e crônica. Estima-se que cerca de 50% dos cães infectados apresentam a forma subaguda da doença. A forma aguda também é comum, e os animais apresentam sinais como apatia, falta de apetite, febre e infecção do trato respiratório inferior. Outros sintomas que podem ser encontrados em ambas as formas são: ceratoconjuntivite seca e anosmia (perda ou diminuição do olfato) (GREENE, 2011; HEADLEY e GRAÇA et al., 2000; NELSON E COUTO, 2015; HEADLEY et al., 2012; SILVA et al., 2009).

A fase severa da doença pode aparecer em animais de qualquer idade, porém a maior prevalência é entre filhotes de três a quatro meses de idade que não foram submetidos à imunização adequada, ou recém nascidos que não receberam anticorpos maternos suficientes. Esses, apresentam evolução rápida e fatal. O estado febril e aumento das tonsilas aparecem como resposta inicial à infecção, porém muitas vezes não são notada pelos tutores. Na maioria dos casos, os primeiros sintomas aparentes são: conjuntivite com secreção branda, que pode variar de serosa a mucopurulenta, seguida de tosse seca, podendo evoluir para úmida e produtiva. A apatia e a anorexia podem vir acompanhadas de vômito. (GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015)

As manifestações neurológicas da cinomose geralmente ocorrem de uma a três semanas após a recuperação da forma sistêmica da doença. No entanto, não existem fatores que impeçam que os sinais apareçam concomitantemente, ou meses depois. A sintomatologia neurológica varia de acordo com o local do sistema nervoso central que foi afetado pelo CDV. A localização da lesão também influencia no prognóstico e na recuperação dessa fase da enfermidade. Dentre as alterações mais comuns estão: alterações comportamentais, crises epiléticas, perda da visão, sinais cerebelares (ataxia da cabeça e tronco, hipermetria), sinais vestibulares (desequilíbrio, desvio de cabeça, nistagmo), paraparesia ou

tetraparesia com ataxia sensorial, atrofia muscular, mioclonias (causada por lesão nos núcleos basais ou relacionada a hiperexcitabilidade dos neurônios motores inferiores) e hiperestesia (SILVA et al., 2009; TIPOLD et al., 1992; HEADLEY et al., 2012; BRITO et al., 2015). Um estudo recente avaliou vinte cães com sequelas neurológicas consequentes da infecção pelo CDV, e concluíram que a mioclonia (80%) é o sinal clínico mais prevalente, seguido por ataxia de cabeça e/ou pescoço (55%), paresia dos membros pélvicos (30%), paralisia dos membros (15%) e rigidez de pescoço (5%) (AGUIAR et al., 2017).

#### 1.4 Sinais Clínicos Neurológicos

A invasão do vírus no sistema nervoso central depende de três fatores: idade, estado imunológico do hospedeiro e cepa do vírus, e estão associadas à persistência da infecção pelo CDV. Os sinais clínicos neurológicos estarão relacionados à desmielinização multifocal progressiva (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005; SILVA et al., 2009). Um estudo antigo demonstrou que anticorpos antivirais estimulavam a produção de radicais livres de oxigênio em cultura cerebral de cães infectados experimentalmente em laboratório pelo CDV (BURGE et al., 1989). Esses radicais livres interferem na produção e lisam proteínas da bainha de mielina através da degradação de fosfolípidos no córtex cerebral, podendo afetar toda a região cortical. De acordo com BRITO et al., (2015), o vírus da cinomose canina é capaz de induzir o desequilíbrio da barreira hematoencefálica, responsável pela proteção do SNC, facilitando assim, a entrada do CDV por essa via. Esse distúrbio favorece as microlesões no tecido nervoso, introduzindo células inflamatórias que auxiliam no processo de desmielinização de forma progressiva (GREENE, 2011; GRONE et al., 2000; MANGIA e PAES, 2008; LEMPP et al., 2014; ABBOTT et al., 2010).

As células mononucleares são as responsáveis pela invasão do vírus no SNC, podendo utilizar a barreira hematoencefálica, líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou epêndima dos ventrículos como via de entrada (FLORES, 2007). Ao ser disseminado para o SNC através do sangue, o CDV invade as substâncias

branca cerebelar e perivascular, trato óptico e medula espinhal (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005, HEADLEY et al., 2012). Ao entrar pelo parênquima cerebral, ele se deposita no espaço perivascular, principalmente em células epiteliais do plexo coróide do quarto ventrículo, podendo invadir o LCR (GREENE, 2011; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005).

Em infecção experimental utilizando *ferrets* (*Mustela putorius furo*) não vacinados observou-se que além da via hematógena, o nervo olfatório também pode servir como porta de entrada para o CDV infectar o sistema nervoso central. No estudo, os autores acompanharam o trajeto do vírus desde os neurônios localizados na mucosa olfatória, passando por filamentos do nervo olfatório através da placa cribiforme do etmóide, seguindo para dentro do glomérulo olfatório, onde ocorre a sinapse no bulbo olfatório, e depois a disseminação para o SNC. Apesar da via ter sido descrita em *ferretes*, os autores acreditam que não seja diferente em cães devido a similaridade da doença em ambas as espécies (RUDD et al., 2006; PRATAKPIRIYA et al., 2017).

A destruição da bainha de mielina é uma lesão frequente que afeta animais de todas as idades, e pode acometer diversas regiões do SNC (SILVA et al., 2007), e está ligada à excessiva replicação viral em células da glia localizadas na substância branca (SILVA et al., 2009, HEADLEY et al., 2012). A desmielinização é caracterizada por vacuolização e perda multifocal da mielina. As lesões podem ser classificadas em agudas, subagudas e crônicas. A forma aguda está ligada à imunossupressão inicial causada pelo vírus, e pode ser definida apenas como processo inflamatório, com aparecimento de vacuolização da mielina com proliferação e hipertrofia de astrócitos, porém sem infiltração mononuclear. Na fase subaguda ocorre a lise da bainha de mielina, e a inflamação pode ser classificada de leve à moderada. Na fase crônica, além da desmielinização, a inflamação é acentuada e acompanhada de malácia (PEREIRA et al., 2014; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005).

A encefalite aguda causada pelo CDV acomete principalmente animais jovens e/ou imunossuprimidos, e é caracterizada pela replicação viral direta. É possível detectar antígeno de CDV e RNA mensageiro (mRNA) nas lesões.



Nesse estágio da doença, o vírus induz a apoptose de células linfóides, afetando principalmente linfócitos CD4+, responsáveis por auxiliar na ativação e maturação de células do sistema imune. O dano causado na substância cinzenta é resultado da infecção e necrose neural, que pode levar à polioencefalomalácia. (GREENE, 2011; ROITT, 2013). A leucoencefalomielite com desmielinização pode ser encontrada de forma aguda quando ocorre lise dos oligodendrócitos, ou de forma crônica devido à inflamação (ZACHARY, 2018).

A encefalite crônica pelo CDV é caracterizada pela diminuição na expressão de antígeno viral e do mRNA, e aumento na resposta inflamatória com desmielinização, podendo levar à necrose tecidual. O vírus pode ser encontrado em células dendríticas foliculares, que se localizam no sistema linfóide (GREENE, 2011; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005).

A encefalite do cão idoso (*Old Dog Encephalitis* - ODE) é uma doença crônica, inflamatória e progressiva relacionada à cinomose, que acomete animais acima de seis anos de idade com funções imunológicas íntegras e que apresentam o vírus de forma persistente nos neurônios. É caracterizada por lesionar a substância cinzenta do hemisfério cerebral e o tronco cerebral. Devido a degeneração neural no córtex cerebral, os animais podem apresentar andar em círculos, depressão, *head pressing* e alterações oculares (GREENE, 2011; NELSON E COUTO, 2015)

A encefalite com corpúsculo de inclusão é a forma variante da encefalite por CDV, podendo ocorrer após a vacinação ou em cães com início repentino da manifestação neurológica da cinomose. Necrose multifocal da substância cinzenta, inflamação linfocitária perivascular e inclusão citoplasmática e intranuclear podem ser observados nesse caso (GREENE, 2011; HEADLEY et al, 2012)

## 1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da cinomose é primeiramente baseado em achados clínicos e exames sorológicos. O histórico de um cão jovem que não foi adequadamente imunizado e apresentando sinais clínicos compatíveis com a doença pode se tornar alicerce para o diagnóstico presuntivo da infecção pelo CDV (GREENE, 2011).

Devido a diminuição da quantidade de células linfóides, a linfopenia é uma alteração frequentemente encontrada, principalmente se o animal for jovem e apresentar rápida progressão tanto da fase sistêmica da doença, quanto da neurológica. Na fase inicial da cinomose, é possível encontrar corpúsculos de inclusão (corpúsculo de Lenz) intracitoplasmáticos e intranucleares em células sanguíneas, astrócitos, neurônios e epitélio de transição da vesícula urinária. Em filhotes infectados durante a gestação ou na fase neonatal, não é raro a presença de hipoglobulinemia em consequência à imunossupressão persistente causada pelo vírus (GREENE, 2011, FLORES, 2007).

Ao analisar o líquido cefalorraquidiano, pode-se detectar um aumento na concentração de proteínas, como a albumina, e na contagem do anticorpo IgG (pleocitose mononuclear). Essas características não são patognomônicas para a infecção pelo CDV, no entanto, confirmam a inflamação presente no sistema nervoso central. É possível que seja feito um diagnóstico presuntivo baseado na comparação entre as titulações dos anticorpos em amostras de LCR e de sangue. Caso seja detectado o aumento na concentração da amostra do líquido cefalorraquidiano, que não esteja contaminada com sangue periférico, pode-se afirmar que os anticorpos foram produzidos pelo sistema nervoso, sugerindo a infecção pelo CDV no local (NELSON e COUTO, 2015).

Estima-se que as inclusões virais permanecem no organismo apenas até o nono dia pós infecção, podendo não ser observados quando os sinais clínicos começam a se manifestar. Esse fato implica que os testes realizados após esse período podem apresentar resultados falso-negativo (NELSON e COUTO, 2015).

A biópsia utilizando tecido epitelial (coxin) é confiável para confirmar de forma definitiva o diagnóstico de cinomose, pois identifica a inclusão e/ou antígeno viral. Outro teste utilizado para a identificação do CDV no organismo é a transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), sendo essa capaz de identificar o RNA do vírus em amostras de sangue periférico, LCR ou raspado conjuntival. As inclusões virais podem ser melhor visualizadas em esfregaço de papa de leucócitos ou punção aspirativa da medula óssea (NELSON e COUTO, 2015; FREIRE et al.; 2019).

Outro teste possível de diagnóstico é o imunoensaio cromatográfico, que detecta de forma qualitativa o antígeno (Ag) do vírus da cinomose canina. Ele é considerado um teste rápido, onde a interpretação do resultado pode ser feita em até 10 minutos após a deposição da amostra no cassete. Pode ser utilizado como material a secreção da mucosa conjuntiva, secreção nasal, urina, saliva, soro, LCR e plasma. O teste é capaz de detectar a proteína F que se encontra na cápsula lipoprotéica que envolve o vírus (RANNO e LESEUX et al., 2018; CURTI et al., 2012; ALERE CINOMOSE Ag TEST KIT, 2017). Porém, quando o teste apresenta resultado negativo deve-se levar em consideração a possibilidade de um exame falso negativo, pois o animal pode não estar na fase virêmica onde é possível detectar o vírus no organismo (CURTI et al., 2011).

## 1.6 Tratamento

O tratamento para cinomose, por se tratar de doença viral, não possui fármacos antivirais específico (ETTINGER e FELDMANO, 2004). Este baseia-se em terapia de suporte com o objetivo de evitar infecções secundárias e promover melhor qualidade de vida ao paciente (GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015; BRITO et al., 2015). No entanto, terapias com proteínas como os interferons, podem apresentar uma melhor resistência contra o vírus em células não infectadas (PEREIRA et al., 2014.). A ribavirina é um agente antiviral que, quando testado "*in vitro*", comprovou ação contra DNA e RNA de alguns vírus, como por exemplo os *herpesvirus*, *poxivirus* e *paramyxovirus*. Quando submetidos a testes "*in vivo*", os *paramyxovirus* revelaram-se sensíveis à droga,

sendo o vírus do sarampo o mais vulnerável ao medicamento. De acordo com ELIA et al. (2008) concentrações baixas de ribavirina (6,5 a 12,5 µg/ mL) “*in vitro*” foram eficazes na prevenção da replicação do vírus da cinomose canina. Já MANGIA et al. (2008) afirmam que a dose de 30 mg/Kg, via oral, a cada 24h, durante 15 dias, associada ao dimetil-sulfóxido (DMSO), parece auxiliar no combate contra o vírus da cinomose canina em pacientes que se encontravam na fase neurológica da doença, porém mais estudos são necessários. O uso do DMSO é uma opinião controverso entre os veterinários por ser um medicamento que apresenta efeitos colaterais como anemia, além de pode apresentar efeitos teratogênicos (MANGIA et al., 2014; DMSO, bula, 2012).

A pneumonia/broncopneumonia é um achado comum em animais infectados pelo vírus da cinomose. No geral, essas infecções se dão de forma secundária, onde a bactéria oportunista se estabelece no organismo. Animais com tais sintomas devem ser tratados com antibióticos específicos para o patógeno envolvido, e expectorantes ou nebulização (ETTINGER e FELDMANO, 2004; GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015; PEREIRA et al., 2014; DORNELLES et al., 2015; TORRES e RIBEIRO et al., 2012). Pacientes que apresentem convulsões devem fazer uso de anticonvulsivante, como o Fenobarbital. Glicocorticóides em dosagem anti-inflamatória e medicamentos antioxidantes como mesilato de deferoxamina (dose de 25 a 50mg/kg IM ou IV) e vitaminas A e E, também podem ser utilizados (PEREIRA et al., 2014; GREENE, 2011; DORNELLES et al., 2015; NEVES et al., 2010). Alguns tratamentos alternativos à medicina convencional já foram descritos. Estudos demonstram que após a fase aguda, a acupuntura obteve resultados satisfatórios relacionado às sequelas da doença (MATTHIESEN et al., 2004). De acordo com SILVA et al., (2009) o estímulo elétrico do córtex motor frontal, pedúnculo cerebelar e pirâmide, é capaz de diminuir ou até cessar a mioclonias. Porém são necessários mais estudos sobre esse tratamento.

A terapia com células-tronco é uma abordagem que vem se mostrando resultados positivos no tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas

(BRITO et al., 2015; SANTOS et al., 2018; GUGJOO et al., 2019; BYDLOWSKI et al., 2009; MARCONI et al., 2013; SPEES et al., 2016).

### 1.7 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são denominadas células progenitoras adultas multipotentes. Elas são células indiferenciadas que apresentam potencial de auto-renovação, alta taxa de proliferação, e capacidade de diferenciação em diversas células do organismo, atuando de forma direta na regeneração de tecidos mesenquimais como. As CTMs podem ser extraídas de tecidos conectivos, como medula óssea e tecido adiposo. (BYDLOWSKI et al., 2009; MAO et al., 2015; ZUK et al., 2002; BRITO et al., 2015; SANTOS et al., 2018; GUGJOO et al., 2019). De acordo com MAO et al. (2015), as CTMs tem a capacidade de migrar para o foco da lesão e atuar em tecidos lesionados de músculo, baço e SNC, sendo que no último sistema elas podem atuar por até 135 dias sem que ocorra modificação significativas na estrutura celular.

As CTMs possuem efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios agindo por meio de ação parácrina (secreção de proteínas/peptídeos e hormônios) e propriedades que inibem a ativação de linfócitos T e células dendríticas. Devido a essas características, estão sendo estudadas como tratamento para lesões inflamatórias e degenerativas. O mecanismo de ação é dado através da atuação na reparação tecidual por meio de modulação, ativação de células endógenas progenitoras e secreção de diversos fatores anti-inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento (BYDLOWSKI et al., 2009; BRITO et al., 2015; MARCONI et al., 2013; SPEES et al., 2016; GUGJOO et al., 2019). Estudos feitos em camundongos revelaram que as CTMs promovem neuroproteção, retardando significativamente a deteriorização motora e mantendo o número de neurônios motores por até 6 semanas (MAO et al., 2015).

Em cães, as células-tronco estão sendo utilizadas como tratamento terapêutico para diversas enfermidades. No caso de doenças que afetam SNC,

como a cinomose, as CTMs conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica através do mecanismo de diapedese, por meio das células endoteliais. Outra hipótese pela qual as células-tronco demonstram facilidade em alcançar o alvo no SNC é a ruptura da barreira hematoencefálica que o vírus da cinomose canina promove, abrindo caminho para a passagem das CTMs (BRITO et al., 2015; LEMPP et al., 2014; ABBOTT et al., 2010; GUGJOO et al., 2019).

PINHEIRO et al. (2019) demonstraram em estudo a resposta de células-tronco mesenquimais autógenas em cães com cinomose que desenvolveram leucoencefalite desmielinizante, resultando em déficit locomotor como sequela. O experimento foi feito com quatro animais (c1, c2, c3 e c4) que apresentavam, além de mioclonia, monoparesia (c1 e c2), deambulação funcional (c3) e tetraparesia (c4). Os autores concluíram que o uso de CTMs foi satisfatório pois após um ano do estudo todos os pacientes apresentaram diminuição na intensidade das mioclonias e eram capazes de se locomover de forma independente.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar uma proposta de protocolo de aplicação de células-tronco mesenquimais para o tratamento de cães com paresia como sequela neurológica em consequência da infecção pelo vírus da cinomose canina.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA (protocolo número 109/2017). As avaliações foram realizadas com o consentimento dos tutores no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (Hvet - UnB), durante o período de outubro de 2017 à junho de 2019. Os critérios de inclusão foram cães sem especificações de raça,

idade, ou sexo, diagnosticados com paresia como sequela neurológica em consequência da infecção pelo vírus da cinomose determinado por meio de avaliação clínica e exame neurológico, perfil hematológico completo e confirmação da infecção por sorologia líquórica ou sanguínea. Os animais que não possuíam sorologia foram submetidos ao teste rápido para detecção do vírus da cinomose canina, tendo como amostra o líquido cefalorraquidiano (LCR) utilizando o teste rápido Alere Cinomose Ag Test Kit®.

O exame neurológico incluiu uma avaliação completa e posteriormente determinação da localização e graduação das alterações. Após essas avaliações, os cães foram classificados de acordo com a graduação abaixo:

Grau I: Ataxia e ou tetra/paraparesia leve;

Grau II: Ataxia e ou tetra/paraparesia moderada;

Grau III: tetra ou paraplegia.

Em virtude da grande quantidade de cães com sequelas crônicas, apresentando histórico compatível com a doença, mioclonias e paresia, porém sem detecção do vírus em amostras de liquor ou sangue, o estudo foi separado em dois grupos. O Grupo 1 com os cães que apresentaram diagnóstico sorológico ou imunoensaio cromatográfico positivo, e o Grupo 2 composto por cães que apresentaram exame laboratorial negativo, porém foram diagnosticados com cinomose de maneira presuntiva, onde levou-se em consideração o histórico do paciente e o quadro clínico onde apresentado.

O protocolo de tratamento incluiu aplicação endovenosa de células-tronco mesenquimais alógenas retiradas de tecido adiposo, provenientes de banco de células da empresa de Terapia Celular BIO CELL em um total de três aplicações de CTMs com intervalo de 21 dias entre elas, associado à fisioterapia com objetivo de potencializar o tratamento. A quantidade estabelecida de células por aplicação foi de  $2 \times 10^6$  CTMs/Kg. As CTMs eram entregues em seringas estéreis e adequadamente armazenadas em caixa de isopor para isolamento térmico. Cada dose de CTMs era previamente homogeneizada, diluídas em 50 ml de solução cristalóide ringer com lactato, novamente homogeneizada e aplicada nos

pacientes via intravenosa, através das veias cefálica ou safena. O procedimento durava cerca de 40 minutos, e os animais não eram submetidos à sedação.

Ao cães eram avaliados por meio de exame neurológico completo e documentação em vídeo antes do início do tratamento (M0), a cada 21 dias antes de cada nova aplicação (M1, M2 respectivamente) e após 21 da última aplicação (M3).

#### *Isolamento, cultivo, congelamento e caracterização de CTMs*

As CTMs foram isoladas e cultivadas a partir de tecido adiposo de um cão doador saudável. Para a coleta do tecido adiposo, o doador foi anestesiado, realizou-se uma incisão na região lombar e, aproximadamente, 20 a 25 gramas de tecido adiposo foi retirado da base da cauda com auxílio de material cirúrgico. O tecido adiposo foi lavado em solução salina para remover resíduos celulares e sanguíneos, cortado em pequenos pedaços e, em seguida, exposto à hialuronidase, para passar por digestão enzimática. Depois disso, as células foram submetidas a um processo de filtração para iniciar uma separação das CTMs. Posteriormente, as células foram colocadas em frascos de cultura com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e foram incubadas a 37,5 ° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, o meio foi descartado com as células não aderentes, e meio de cultura fresco foi adicionado às garrafas. O meio foi trocado uma vez a cada 3 dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando a tripsinização foi realizada para retirar as células das garrafas, contar na câmara de Neubauer e envasá-las em palhetas (1 milhão de células / palheta) para congelamento com DMSO e SFB em nitrogênio líquido (De Rosa et al., 2009; Cui & Pu, 2010). Cinco palhetas (5 milhões de células) foram descongeladas para caracterização de CTMs.

Os testes de caracterização de CTMs foram realizados conforme determinado pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (Dominici et al., 2006). Os marcadores de superfície positivos para as CTMs testadas foram CD29-RD1 de rato anti-humano, CD44-FITC de rato anti- equino, caprina anti-canina CD90 primária e IgM de rato conjugado anti-caprino AF594 (secundário).



O marcador de superfície negativo foi CD34-FITC anti-humano de rato. A função das CTMs também foi analisada pela presença de duas proteínas citoplasmáticas específicas (marcadores intracelulares) para diferenciação celular: SOX2 e OCT3 / 4. Esses marcadores foram avaliados pelo método de imunofenotipagem no citômetro de fluxo de Imagem Amnis®.

A capacidade das células se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos também foi confirmada. As células foram avaliadas quanto a contaminantes (bactérias, fungos, micoplasma), utilizando a reação em cadeia com polimerase (Veriti Thermal Cycler - ThermoFischer Scientific). Além disso, a viabilidade das células após o descongelamento foi avaliada por citômetro de fluxo com o kit de anexina Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 e iodeto de propídio (PI) (ThermoFischer Scientific <sup>TM</sup>) no citômetro de fluxo de imagem Amnis®.

#### **4. RESULTADOS**

Para a realização deste estudo foram tratados nove cães, sendo os sem raça definida (n=8) os mais prevalente, e apenas um cão da raça boxer. As idades variam entre 6 meses e 8 anos (média = 3,3 anos), sendo quatro cães machos e cinco fêmeas. Após avaliação neurológica antes do início do tratamento (M0), os pacientes foram classificados de acordo com o grau da lesão, obtendo-se dois cães Grau I, dois cães Grau II e cinco cães Grau III, como demonstrado na Tabela 1. Do total de cães, três tiveram diagnóstico positivo para cinomose, e seis foram considerados casos crônicos. Durante a aplicação endovenosa das células-tronco, nenhum paciente (n=0) apresentou reação alérgica e/ou de compatibilidade com o tratamento.

Do total de pacientes, apenas 1 (11,1%) apresentou histórico de estímulo da musculatura atrofiada por meio de fisioterapia e acupuntura por aproximadamente 30 dias, período prévio ao tratamento com as células-tronco. No entanto, apesar do cuidado e conscientização do tutor, o cão não havia apresentado melhora em ambos quadro neurológico e desenvolvimento muscular. O total de 66,7% (n=6) foram resgatados das ruas sem histórico de

vacinação e apresentando algum tipo de sequelas da cinomose. Destes, 33,3% (n=2) apresentavam paresia no momento do resgate, e 66,7% (n=4) começaram a manifestar os sintomas até trinta dias após serem resgatados. O tratamento com CTMs começou em média quatro meses após esses animais apresentarem paresia. Os outros três cães que participaram do projeto (33,3%) foram adotados e não apresentavam sinais clínicos relacionados à cinomose no momento da adoção. Destes, apenas 33,3% (n=1) apresentou histórico de vacinação, porém o tutor alega que a qualidade da vacina era de origem duvidosa. Todos os animais adotados receberam tratamento clínico no início da doença, e o tratamento com CTMs após, em média, 3 meses do início da paresia.

**TABELA 1 - Identificação dos pacientes e classificação de acordo com grau da lesão neurológica avaliada em M0.**

Paciente	Idade	Raça	Sexo	Lesão	Grau
<b>Baronesa</b>	8 meses	SRD	F	Paraparesia MP	I
<b>Cléo</b>	7 meses	SRD	F	Paraparesia MP	I
<b>Pantera</b>	1 ano	SRD	F	Paraparesia MP	II
<b>Tina</b>	6 meses	SRD	F	Tetraparesia	II
<b>Tisso</b>	7 anos	Boxer	M	Tetraparesia	III
<b>André</b>	6 anos	SRD	M	Tetraparesia	III
<b>Ringo</b>	1 ano	SRD	M	Paraparesia MP	III
<b>Spyke</b>	5 anos	SRD	M	Paraparesia MTE e MPD	III
<b>Vitória</b>	8 anos	SRD	F	Tetraparesia	III

A Tabela 2 demonstra a evolução do quadro clínico de cada paciente. Foram descritos sinais clínicos neurológicos que fugiam do padrão de normalidade em M0, seguido pela evolução nos retornos dos paciente ao hospital em M1, M2 e M3.

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
Baronesa	M0	Tetraparesia não deambulatória	Atrofia MPs	Reflexo pupilar = 0 (midríase)	PPC e saltitar 0 nos 4 membros	Flexores: MTs = 1 MPs = 0
	M1	Paraparesia nos MPs	Atrofia MPs	Reflexo pupilar = 1	PPC e saltitar: MTs=2 MPE=1 e MPD=0	Flexores: MTs = 2 MPs = 1
	M2	Postura normal com ataxia em MPs	Normal	Reflexo pupilar = 1	PPC: MTs=2 MPs=0. Saltitar: MTs=2 MPE=1 MPD=0	Flexores: MTs = 2 MPs = 1
	M3	Postura normal com leve ataxia em MPs	Normal	Normal	PPC: MTs=2 MPs=0. Saltitar: MTs=2 MPE=1 MPD=0	Flexores: MTs = 2 MPs = 1
Cléo	M0	TPE com ataxia em MPs	Atrofia generalizada	Normal	PPC e saltitar 0 nos 4 membros	Flexores: MTs = 0 MPs = 1
	M1	TPE	Atrofia generalizada	Normal	PPC e saltitar 0 nos 4 membros	Flexores: MTs = 0 MPs = 1

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
Cléo	M2	TPF	Atrofia generalizada	Normal	PPC e saltitar 0 nos 4 membros	Flexores: MTD= 1 MTE=0 MPs=0
	M3	TPF	Atrofia em MTs	Normal	PPC: MTE=0 MTD=1 MPE=1 MTD=0. Saltitar: MTE=0 MTD=1 MPs=1	Flexores: MTE = 0 MTD=1 MPs = 2
Pantera	M0	PPE nos MTs	Normal	Sensibilidade nasal= 1	PPC e saltitar MTs = 2 MPs = 1	Flexores: MTs = 2 MPD = 2 MPE = 1 Patelar: MPE = 1 MPD = 2
	M1	Normal com ataxia MPs	Normal	Normal	PPC e saltitar MTs = 2 MPs = 1	Flexores: MTs = 2 MPD = 2 MPE = 1 Patelar: MPE = 1 MPD = 2
	M2	Normal	Normal	Normal	PPC e saltitar MTs = 2 MPE = 2 MPD = 0	Flexores: MTs = 2 MPD = 2 MPE = 1 Patelar: 2

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/ Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
	<b>M3</b>	Normal	Normal	Normal	PPC: todos os membros = 2 Saltitar: MTs = 2 MPE = 2 MPD = 0	Flexores e Patelares = 2
<b>Tina</b>	<b>M0</b>	Tetraparesia não deambulatória, pior em MPs.	Normal	Normal	PPC e saltitar MTs = 2 MPs = 0	Flexores: MTs=2 MPs=0
	<b>M1</b>	Tetraparesia não deambulatória, pior em MPs.	Normal	Normal	PPC e saltitar MTs = 2 MPs = 0	Flexores: MTs=2 MPs=0
	<b>M2</b>	Normal com discreta ataxia em MPs	Normal	Normal	PPC 2 em todos os membros. Saltitar: MTs=2 MPs=1	Flexores: MTs=2 MPE=1 MPD=2
	<b>M3</b>	Normal com discreta ataxia em MPs	Normal	Normal	PPC 2 em todos os membros. Saltitar: MTs=2 MPs=1	Flexores: MTs=2 MPE=1 MPD=2

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
Tisso	M0	TPE com ataxia nos 4 membros	Atrofia generalizada	Sensibilidade nasal =1	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: 1 em todos os membros
	M1	TPF	Atrofia generalizada	Sensibilidade nasal = 0	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: 1 em todos os membros
	M2	TPF	Atrofia generalizada	Sensibilidade nasal = 0	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: 1 em todos os membros
	M3	TPF em MPs.	Atrofia generalizada	Sensibilidade nasal = 0	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: 1 em todos os membros
André	M0	TPE	Atrofia generalizada	Reflexo pupilar 0	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: MTs=0 MPs=1
	M1	TPE	Atrofia generalizada	Reflexo pupilar 1	PPC e saltitar 0 em todos os membros	Flexores: MTs=2 MPs=1

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
André	M2	Tetraparesia	Atrofia em cabeça	Reflexo pupilar 1	PPC MTE, MPs = 0 MTD = 2 Saltitar MTE=1 MTD e MPs=0	Flexores: MTs=1 MPs=1
	M3	Normal, discreta ataxia em MPs	Atrofia em cabeça	Reflexo pupilar = 0 (midríase)	PPC e Saltitar = 2	Flexores: 2 em todos os membros
Ringo	M0	PPE nos MPs	Atrofia generalizada	Normal	PPC MTD = 1 MTE = 2 MPs = 0 Saltitar 0 em todos os membros.	Flexores: MTE = 2 MTD e MPs = 0 Patelar: 1
	M1	PPE nos MPs	Atrofia generalizada	Normal	PPC MTD = 1 MTE = 2 MPs = 0 Saltitar 0 em todos os membros.	Flexores: MTE = 2 MTD e MPs = 0 Patelar: 1

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/ Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
Ringo	M2	PPE no MPE	Atrofia MTs e cabeça	Normal	PPC MTD = 1 MTE = 2 MPD = 0 MPE = 1 Saltitar MTD = 1 0 nos outros membros	Flexores: MTD = 0 MTE = 1 MPs = 2
	M3	PPE no MPE	Atrofia MTs e cabeça	Normal	PPC MTD = 1 MTE = 2 MPD = 0 MPE = 1 Saltitar MTD = 1 0 nos outros membros	Flexores: MTD = 0 MTE = 1 MPs = 2
Spyke	M0	PPE com impotência funcional em MTD	Atrofia cabeça, MTD e MPE	Normal	PPC MTD = 0 MTE = 2 MPD = 2 MPE = 1	Flexores: MTE = 2 MTD e MPs = 1
	M1	PPE com impotência funcional em MTD	Atrofia cabeça, MTD e MPE	Normal	PPC MTD = 0 MTE = 2 MPD = 2 MPE = 1	Flexores: MTE = 2 MTD = 0 MPs = 1
	M2	PPE com impotência funcional em MTD	Atrofia cabeça, MTD e MPE	Normal	PPC MTD = 0 MTE = 2 MPD = 2 MPE = 0	Flexores: MTE e MPD = 2 MTD e MPE = 1



TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
	<b>M3</b>	MTD com impotência funcional, outros membros normais.	Atrofia cabeça, MTD	Normal	PPC MTD = 0 MTE = 2 MPD = 2 MPE = 1	Flexores: MTE = 2 MTD = 1 MPs = 2
<b>Vitória</b>	<b>M0</b>	Tetraparesia não deambulatória	Atrofia generalizada com desvio de pescoço para direita	Normal	PPC MTs = 0 MPs = 1 Saltitar 0 em todos os membros	Normal
	<b>M1</b>	TPE	Atrofia generalizada com desvio de pescoço para direita	Normal	PPC MTD = 0 MTE e MPs = 2 Saltitar 0 em todos os membros	Normal
	<b>M2</b>	TPE	Atrofia generalizada com desvio de pescoço para direita	Normal	PPC MTD = 0 MTE e MPs = 2 Saltitar 0 em todos os membros	Normal

TABELA 2 - Evolução do quadro clínico dos cães.						
Paciente	Momento da Avaliação	Postura/Marcha	Palpação Muscular	Nervos Cranianos	Reações Posturais	Reflexos Segmentares
	<b>M3</b>	TPE, se sustenta em pé com auxílio de cadeira de rodas	Atrofia generalizada com desvio de pescoço para direita	Normal	PPC MTD = 0 MTE e MPs = 2 Saltitar: MTD e MPD = 0 MTE = 1 MPE = 2	Normal

**Legenda Tabela 2** - MPs: membros pélvicos. MPE: membro pélvico esquerdo. MPD: membro pélvico direito. MTs: membros torácicos. MTE: membro torácico esquerdo. MTD: membro torácico direito. TPE: tetraparesia espástica. TPF: tetraparesia flácida. PPE: paraparesia espástica. PPF: paraparesia flácida. PPC: propriocepção consciente. 0 = ausente, 1 = diminuído e 2 = normal.

As Tabelas 3 e 4, a seguir, mostram a frequência em que os principais sinais clínicos neurológicos, de acordo com a literatura, foram relatados em nossos pacientes, comparando o momento prévio à aplicação das CTMs (M0), e 21 dias após a última aplicação das células-tronco (M3).

TABELA 3 - Sequelas neurológicas mais frequentes no estudo em M0		
Sintomas M0	Quantidade de pacientes (0 a 9)	Porcentagem (%)
<b>Tetra/paraparesia</b>	9	100
<b>Desequilíbrio</b>	9	100
<b>Mioclonia</b>	7	77,8
<b>Atrofia Muscular</b>	7	77,8
<b>Crises Epilépticas</b>	3	33,3
<b>Ataxia Cabeça/Tronco</b>	2	22,2
<b>Desvio de Cabeça</b>	1	11,1
<b>Nistagmo</b>	1	11,1

**TABELA 4 - Desenvolvimento das sequelas neurológicas mais frequentes no**

<b>Sintomas M3</b>	<b>Quantidade de pacientes (0 a 9)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
<b>Tetra/paraparesia</b>	4	44,4
<b>Desequilíbrio</b>	6	66,7
<b>Mioclonia</b>	7	77,8
<b>Atrofia Muscular</b>	5	55,6
<b>Crises Epilépticas</b>	3	33,3
<b>Ataxia Cabeça/Tronco</b>	1	11,1
<b>Desvio de Cabeça</b>	1	11,1
<b>Nistagmo</b>	0	0

De acordo com a Tabela 2, é possível notar que todos os pacientes apresentaram algum tipo de melhora no quadro clínico. Apenas 22,2% (n=2) dos cães não demonstraram evolução em relação à locomoção, onde apresentaram tetraparesia tanto em M0 quanto em M3. 44,4% (n=4) dos cães apresentaram melhora total, sendo que 75% (n=3) destes apresentaram tetraparesia em M0 e postura normal em M3, e 25% (n=1) apresentou paraparesia em M0 e postura normal em M3. Os outros 33,3% (n=3) apresentaram melhora parcial, sendo que 33,3% (n=1) destes apresentou tetraparesia em M0 e paraparesia em M3, e 66,7% (n=2) apresentaram paraparesia em M0 e paresia de apenas um membro em M3.

As Tabelas 3 e 4 demonstram de forma comparativa a evolução de cada sinal neurológico apresentado pelos cães. Houve uma redução de 55,6% dos casos de tetra/paraparesia, 33,4% de desequilíbrio, 11,1% de ataxia e 100% do nistagmo. Não foi notada redução total nos casos de mioclonia, porém 44,4% (n=4) dos pacientes apresentaram melhora na frequência e/ou intensidade. Os pacientes que apresentavam crises epiléticas e desvio de pescoço não apresentaram melhora em relação a esses sintomas.

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, o grupo mais afetado pelo vírus da cinomose são filhotes e cães que não foram imunizados. Além disso, as sequelas neurológicas mais frequentes são: alterações comportamentais, crises epiléticas, perda da visão, ataxia da cabeça e tronco, desequilíbrio, desvio de cabeça, nistagmo, paraparesia ou tetraparesia com ataxia sensorial, atrofia muscular, mioclonias e hiperestesia. (GREENE, 2011; NELSON e COUTO, 2015; SILVA et al, 2009; TIPOLD et al, 1992; HEADLEY et al, 2012; BRITO et al, 2015). No presente estudo foram registrados cinco cães de até um ano de idade, e quatro entre cinco e oito anos, tendo apenas um com histórico de vacinação. Além disso, estavam presentes oito dos onze sinais clínicos mais frequentes, corroborando com os dados de literatura. Alterações comportamentais, perda da visão e hiperestesia não foram registradas. Apesar de não termos pacientes com perda de visão, dois cães (n=2) apresentavam úlcera de córnea em M0.

O diagnóstico definitivo da cinomose pode ser difícil pois é necessário que sejam encontradas partículas virais, ou corpúsculos de inclusão, em células sanguíneas, astrócitos, LCR, neurônios e epitélio de transição da vesícula urinária. As inclusões virais só estão presentes na fase inicial da doença, pois acredita-se que permanecem no organismo apenas até o nono dia após a infecção, onde, geralmente, os sinais clínicos ainda não começaram a ser manifestados. Após essa fase torna-se mais difícil a detecção do vírus (GREENE, 2011; FLORES, 2007; NELSON e COUTO, 2015). Devido a esse curto período, o diagnóstico algumas vezes é dado de forma presuntiva, onde são associados os sinais clínicos com o histórico do paciente, que na maioria das vezes é jovem e não foi adequadamente imunizado. A demora do diagnóstico faz com que a doença progrida e adquira a forma crônica tornando o tratamento com células-tronco menos eficaz, pois são lesões mais antigas com o nível avançado de degeneração das células afetadas.

A administração de CTMs via endovenosa é considerada segura, sendo essa a maneira mais utilizada devido ao fácil posicionamento anatômico, onde o

acesso de eleição é através das veias cefálica ou safena, e possibilidade de realizar mais de uma aplicação com efeitos colaterais mínimos, por ser um acesso pouco traumático e não invasivo. Afim de evitar reações relacionadas a agregação celular com formação de possíveis trombos, é necessário que a velocidade e a concentração das CTMs sejam criticamente reguladas (SANTOS et al., 2018). Neste estudo, a concentração de CTMs utilizada foi de  $2 \times 10^6$  CTMs/kg diluídas em 50ml de solução fisiológica ringer com lactado, e aplicada em velocidade de aproximadamente 40 minutos através da veia cefálica. Caso não fosse possível este acesso devi à mioclonia dos pacientes, a veia safena era a próxima escolha pela facilidade da punção. Com esse protocolo, mesmo utilizando células alogênicas, nenhum paciente apresentou reação alérgica, ou de compatibilidade, e/ou sinais de trombose devido à agregação de CTMs durante ou após o procedimento. Foi observado que os animais começaram a responder ao tratamento em momentos diferentes, reforçando que a infecção e a recuperação estão relacionados à idade do paciente, ao estado imunológico, à cepa do vírus e ao tempo de persistência deste no organismo (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN et al., 2005; SILVA et al., 2009). Notou-se que cães mais jovens ( $n=3$ ) apresentaram melhora significativa entre a primeira e a segunda aplicação de células-tronco. Já pacientes mais velhos ( $n=2$ ) apresentaram resultado desejado após a terceira aplicação de CTMs, sendo sugerido uma quarta aplicação de células-tronco, fugindo do protocolo sugerido por esta pesquisa. Essa diferença de velocidade de resposta pode estar relacionada à imunidade mais responsava apresentada por animais mais jovens, e à cronicidade da doença, onde existem maior degeneração das estruturas afetadas.

Em um estudo recente foram avaliados quatro animais com cinomose que desenvolveram déficit locomotor como sequela da leucoencefalite dismielinizante. No momento da avaliação inicial os cães c1 e c2 apresentaram paresia do MPD e déficit de propriocepção, o c3 apresentou deambulação funcional e c4 tetraparesia com déficit de propriocepção e rigidez cervical (PINHEIROS et al., 2019), sinais clínicos similares aos apresentados no presente estudo. Após a terceira aplicação de CTMs, os autores relataram melhora dos

cães, sendo que c1 apresentou locomoção normal do MPD, c2 não apresentou evolução em relação à paresia, porém a propriocepção consciente estava normal. C3 não apresentou alterações neurológicas, e c4 permaneceu tetraparésico, porém apresentou ausência da rigidez cervical (PINHEIROS et al., 2019).

Para o presente estudo foram escolhidos animais que, apesar das sequelas da cinomose, apresentavam-se estáveis e sem complicações secundárias, para possibilitar avaliação de forma mais objetiva, assim como utilizado em outros estudos. Os cães que passaram por tratamento clínico não apresentaram melhora em relação ao déficit motor (PINHEIRO et al., 2019). Portanto, foram selecionados cães com diversos graus de paresia e que não estivessem na fase virêmica da doença, pois estudos demonstram que na fase aguda, com o vírus da cinomose ativo, o tratamento não atinge resultados positivos, e os animais não apresentam melhora (PINHEIRO et al., 2016). Seis animais foram considerados crônicos e obtiveram o diagnóstico de forma presuntiva por apresentarem resultados negativos em sorologia e/ou imunoensaio cromatográfico, e terem como principais sintomas os sinais clássicos da cinomose, tais como paresia, ataxia, mioclonia e atrofia muscular. Além disso, apenas um destes paciente apresentava histórico de vacinação, porém o tutor relatou não ter certeza da qualidade do armazenamento da vacina. Todos os cães que apresentaram exame sorológico ou imunoensaio cromatográfico positivo (Grupo 1, n=3), se recuperaram de forma parcial (33,3%, n=1) ou total (66,7%, n=2). Já os animais do Grupo 2 (n=6), com diagnóstico presuntivo, 33,3% (n=2) não tiveram evolução, 33,3% (n=2) evoluíram parcialmente e 33,3% (n=2) apresentaram recuperação total. Esses resultados mostram que o tempo de lesão influencia diretamente na resposta das CTMs à lesão, e no resultado do tratamento.



**FIGURA - 1:** André em M0. Tetraparesia espástica com ausência de propriocepção consciente.  
Fonte: própria.



**FIGURA - 2:** André 4 meses após o fim do tratamento apresentando recuperação total. Fonte: própria.



Das duas pacientes que não obtiveram evolução na locomoção, uma estima-se a idade de 8 anos e pertencia ao Grupo III, com lesões crônicas e severas. Porém, ao final do tratamento, apesar de não andar sozinha, apresentou recuperação total na propriocepção consciente do membro torácico esquerdo e dos membros pélvicos, conseguindo se equilibrar na cadeira de rodas. A outra cadela apresentava intensa mioclonia nos músculos mastigatórios, sendo necessária intervenção cirúrgica para extração de alguns dentes, afim de evitar mais lacerações nos lábios e gengiva. Após essa ser submetida ao procedimento anestésico, o animal apresentou piora no quadro neurológico, onde apresentava paresia dos membros pélvicos com ataxia dos quatro membros, e após o procedimento apresentou-se em decúbito sem movimentação dos membros, sem evolução durante as últimas aplicações de CTM no tratamento.

Os animais que apresentaram melhora parcial (n=3) eram originalmente pertencentes ao Grau III da escala de grau de lesão (paraparesia), e após o tratamento foram considerados Grau II (ataxia e ou tetra/paraparesia moderada).



**FIGURA - 3:** Spyke em M0. Paraparesia espástica com impotência funcional de membro torácico direito. Fonte: própria.





**FIGURA - 4:** Spyke um mês após o fim do tratamento, apresentando melhora dos membros pélvicos e membro torácico esquerdo, porém impotência funcional de MTD . Fonte: própria

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que durante o tratamento todos os cães apresentaram alguma melhora do quadro neurológico, evidenciando o potencial do uso de células-tronco mesenquimais no tratamento para sequelas neurológicas da cinomose canina. Sendo assim, pode-se indicar o protocolo de três aplicações endovenosas de  $2 \times 10^6$  CTMs/Kg com intervalo de 21 dias entre elas, de forma segura, podendo, assim, sugerir que as aplicação de CTMs sejam uma realidade na clinica média de pequenos animais.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J; PATABENDIGE, A. A. K; DOLMAN, D. E. M; YUSOF, R. R; BEGLEY, J. **Structure and Function of the Blood-Brain Barrier**. Neurobiology of Disease, Elsevier, 2010. V. 37, Issue 1, p. 13-25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030

AGUIAR, E. C.; TEÓFILO, T. S.; COSTA, A. C. C.; MARTINS, N. S.; OLIVEIRA, R. M.; MAGALHAES, I. F. B.; TORRES, M. A. O. **Avaliação Neurológica de Cães Infectados Naturalmente pelo Vírus da Cinomose Canina**. Medicina Veterinária (UFRPR), 2017. v.11. n.3. p. 157-161.

ALERE CINOMOSE Ag TEST KIT. Gustavo Bezzuoli Mani, Belo Horizonte, Alere S/A, 2017. Bula de teste rápido.

BORBA, T. R; MANNIGEL, R. C; FRAPORTI, C. K; HEADLEY, S. A; SAITO, T. B. **Cinomose: Dados Epidemiológicos Maringá-PR**. Iniciação Científica Cesumar, 2002. V. 04, n. 01. p. 53-56.

BRITO, H. F. V.; **Utilização de Células Mononucleares de Medula Óssea para o Tratamento de Sequelas Neurológicas de Cinomose Canina**. 2015. 78 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias). Programa de pós-graduação. Universidade Federal do Paraná - UFPR-, Setor de Ciências Agrárias. Curitiba.

BURGE, C.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M.; PETERHANS, E. **Antiviral Antibodies Stimulate Production of Reactive Oxygen Species in Cultured Canine Brain Cells Infected with Canine Distemper Virus**. Institute of Veterinary Virology and Animal Neurology, University of Berne. Journal of Virology, 1989, v. 63, n. 3, p. 2790-2797. doi: 10.1093/jvi/63.3.2790

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. **Características Biológicas das Células-Tronco Mesenquimais**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

CUI X., PU L.L. (2010) **The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part I. In vivo study**. Aesthetic Surgery Journal, 30, 248-252.

CURTI, M. C.; ARIAS, M. V. B.; ZANUTTO, M. S. **Avaliação de um Kit de Imunoensaio Cromatográfico para Detecção de Antígeno do Vírus da Cinomose em Cães com Sinais Sistêmicos ou Neurológicos da Doença**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2383-2390, nov./dez. 2012. DOI :10.5433/1679-0359.2012v33n6p2383

DE FRANCESCO F., RICCI G., D'ANDREA F., NICOLETTI G.F., FERRARO G.A. (2015) **Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside**. Tissue Engineering, 21, 572-584.

DE ROSA, A., DE FRANCESCO, F., TIRINO, V., FERRARO, G.A., DESIDERIO, V., PAINO, F., PIROZZI, G., D'ANDREA, F., PAPACCIO, G. (2009) **A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and**

**suitable large-scale and long-term cell banking technology.** Tissue Engenning, 15, 659-667.

DEEM, S. L.; SPELMAN, L. H.; YATE, R. A.; MONTALI, R. J. **Canine Distemper in Terrestrial Carnivores: a review.** Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 31, n. 4, p. 441-451, 2000.

DMSO, VETNIL, 2012. Bula de remédio.

DOMINICI M., LE BLANC K., MUELLER I., SLAPER-CORTENBACH I., MARINI F., KRAUSE D., DEANS R., KEATING A., PROCKOP D., HORWITZ E. (2006) **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy, 8, 315–317.

DORNELLES, D. Z.; PEZZUTTI, P.; PANIZZON, A.; SPERING, R. R.; SANTOS, I. R.; ESTRAL, A.F.; GOTTLIEB, J.; OLIVEIRA, F. **Protocolos Terapêuticos Utilizados no Tratamento da Cinomose Canina no Alto Uruguai Gaúcho e Oeste Catarinense.** RMVI, 2015. v. 02, n.03. ISSN 2358-2243

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; CARUSO, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; ORMAS, P. **In Vitro Efficacy of Ribavirin Against Canine Distemper Virus.** Elsevier, 2007. Antiviral Research 77 (2008), p. 108 - 113. doi:10.1016/j.antiviral.2007.09.004

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** 5.e.d. Guanabara Koogan, 2004. v.1. p. 440.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** 4.e.d. Editora Manole LTDA, 1995. v.1. p. 576 - 580.

FLORES, E. F., **Virologia Veterinária.** Edição única. Editora UFSM, 2007. 888 p.; p. 674-678

FREIRE, C. G. V.; MORAES, M. E. **Cinomose Canina: aspectos relacionados ao diagnóstico, tratamento e vacinação.** PUBVET, 2019. v.13.n.2, a263. p. 1-8. Doi: 10.31533/pubvet.v13n2a263.1-8

GREENE, C. E. **Infection Diseases of the Dog and Cat.** 4.ed. Elsevier, 2011. p. 25 - 42.

GRONE, A.; ALLDINGER, W.; BAUMGARTNER, W. **Interleukin-1 $\beta$ , -6, -12 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression in Brain of Dogs With Canine Distemper Virus Infection.** Journal of Neuroimmunology, Elsevier Science, 2000. p. 20 - 30. doi: 0165-5728/00/\$

GUGJOO, M.B.; AMARPAL, A.; SHARMA, G. T. **Mesenchymal Stem Cell Basic Research and Application in Dog Medicine.** Journal of Cellular Physiology, Wiley, 2019.p. 1-33. DOI: 10.1002/jcp.28348

HEADLEY, S. A; GRAÇA, D. L. **Canine Distemper: Epidemiological Findings os 250 Cases.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci, 2000. v.37, n. 2, p. 136-140.

HEADLEY, S. A; AMUDE, A. M; ALFIERI, A. F; BRACARENSE, A. P. F. R. L; ALFIERI, A. A. **Epidemiological Features and the Neuropathological Manifestations of Canine Distemper Virus-Induced Infections in Brazil: a review.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2012. v. 33, n. 5, p. 1945-1978. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n5p1945

HLEBOKAZOV, F; DAKUKINA, T; IHNATSENKO, S; KOSMACHEVA, S; POTAPNEV, M; SHAKHBAZAU, A; GONCHAROVA, N; MAKHROV, M; KOROLEVICH, P; MISYUK, K; DAKUKINA, V; SHAMRUK, I; SLOBINA, E; MARCHUK, S. **Treatment of Refractory Epilepsy Patients with Autologous Mesenchymal Stem Cells Reduces Seizure Frequency: An Open Label Study.** Medical University of Bialystok. Elsevier, 2017. p. 1896-1126. Achado em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2016.12.004>

LEMPP, C; SPITZBATH, I; PUFF, C.; CANA, A.; KEGLER, K.; TECHNGAMSUWAN, S.; BAUMGARTNER, W.; SEEHUSEN, F. **New Aspects os te Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis.** Viruses, 2014. v. 6, issue 7. p. 2571-2601. DOI: 10.3390/v6072571

LINDROOS, B., SUURONEN, R., MIETTINEN, S. (2011) **The potential of adipose stem cells in regenerative medicine.** Stem Cell Rev., 7 (2), 269-291.

LÚCIO, E. C; PIMENTEL, J. L; CLEMENTE, S. M. S; MACHADO, A. C; OLIVEIRA, J. M. B; BRANDESPIM, D. F; JÚNIOR, J. L. S; JÚNIOR, J. W. P. **Análise Epidemiológica de Infecção pelo Vírus da Cinomose, em Cães no Município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2014. v. 35, n. 3, p. 1323-1330. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1323

MANGIA, S.H. **Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso de ribavirina e dimetil-sufóxido (DMSO).** Botucatu, 2008. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2008

MANGIA, S. H.; MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K.; MOTTA, E. G.; FRANCO, M. M. J.; MEGID, J; SILVA, A. V.; PAES, A. C. **Efeitos Colaterais do Uso da Ribavirina, Prednisona e DMSO em Cães Naturalmente Infectados pelo Vírus da Cinomose.** Pesq. Vet. Bras, 2014. v. 34. n. 5. DOI: S0100-736X2014000500011

MANGIA, S.H; PAES, A.C. **Neuropatologia da Cinomose.** Vet. E Zootec. v.15, n. 3, 2008. p. 416 - 427.

MAO, Z.; ZHANG. S.; CHEN, H. **Stem Cell Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis.** Cell Regeneratio, 2015. doi: 10.1186/s13619-015-0026-7

MARCONI, S.; BONACONSA, M.; SCAMBI, I.; SQUINTANI, G.M.; RUI, W.; TURANO, E.; UNGARO, D.; D'AGOSTINO, S.; BARBIERI, F.; ANGIARI, S.; FARINAZZO, A.; CONSTANTIN, G.; CARRO, U.D.; BONETTI, B.; MARIOTTI, R.; **Systemic. Treatment with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Clinical and Pathological Features in the Amyotrophic Lateral**

**Sclerosis Murine Model.** Neuroscience, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.034>

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. **Canine Distemper Virus.** Elsevier, 2008. Vet Clin Small Anim 38. p. 787 - 797. doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.007

MATTHIESEN, A. D. **Acupuntura no Tratamento da Cinomose Canina.** 2004. 52 f. Dissertação (Especialização em Veterinária). Faculdade de medicina veterinária e zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP- Campus Botucatu.

MARX C., SILVEIRA M.D., BEYER N.N. (2015) **Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications.** Stem Cells Dev., 24 (7), 803-13.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais.** 5.e.d. Elsevier, 2015. p. 1341 - 1344

NEVES, I. V; TUDURY, E. A.; COSTA, R. C. **Fármacos Utilizados no Tratamento das Infecções Neurológicas de Cães e Gatos.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2010. v. 31, n. 3, p. 745-766

PEREIRA, M. A.; LOBO, L. M.; OLIO, R. L.; SANTOS, A. C.; VIANA, D. C. **Aspectos Gerais da Cinomose.** Enciclopédia Biosfera, 2014. v.10, n.18; p. 427.

PINHEIRO, A. O.; CARDOSO, M. T.; VINADE, A. S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A. L. F.; SOUSA, R. L. M.; FANTINATO-NETO, P.; OLIVEIRA, V. C.; LARA, V. M.; AMBRÓSIO, C.E. **Controversial Results of Therapy with Mesenchymal Stem Cells in the Acute Phase of Canine Distemper Disease.** Genetics and Molecular Research 15 (2), 2016. DOI: 10.4238/grm.15028310

PINHEIRO, L. L.; LIMA, A. R.; MARTINS, D. M.; OLIVEIRA, E. H. C.; SOUZA, M. P. C.; MIRANDA, C. M. F. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; RUSSO, F. B.; PIGNATARI, G. C.; FILHO, E. S.; BRANCO, E. **Mesenchymal Stem Cells in Dogs with Demyelinating Leukoencephalitis as an Experimental Model of Multiple Sclerosis.** Heliyon, Elsevier, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01857

PRATAKPIRIYA, W; TEH, A. P. P.; RADTANAKATIKANON, A; PIRARAT, N.; LAN, N. T.; TECHNGAMSUWAN, S.; YAMAGUCHI, R. **Expression of Canine Distemper Virus Receptor Nectin-4 in the Central Nervous System of Dogs.** Scientific Reports, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-00375-6

RANNO, I. L; LESEUX, C. **Diagnóstico de Cinomose Canina por Teste Rápido no Hospital Veterinário FAG.** 2º Congresso Nacional de Medicina Veterinária FAG. Emavet FAG. 2018.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R. **Fundamentos da Imunologia.** 12 e.d. Guanabara Koogan, 2013. p. 212

Romagnoli C., Brandi M.L. (2014) **Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering.** World J Stem Cells, 6 (2), 144-152.

RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; MESSLING, V. **Canine Distemper Virus Uses Both the Anterograde and the Hematogenous Pathway for Neuroinvasion**. Journal of Virology, 2006. v. 80. No. 19. p. 9361 - 9370. doi: 10.1128/JVI.01034-06

SANTOS, E. J. C. **Premissas da Terapia Celular no Contexto da Medicina Veterinária**. Revista Científica Integrada - UNAERP, 2018. Ed. 3. Vol. 3.

SILVA, M. C. **Neuropatologia da Cinomose Canina**. 2009. 118 f. Dissertação (Doutorado). Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. **Aspectos clínicopatológicos de 620 casos neurológicos cinomose em cães**. Pesq. Vet. Bras., 2007. v. 27, n. 5, p. 215-220. DOI: 10.1590/S0100-736X2007000500006

SPEES, J. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. **Mechanisms of Mesenchymal Stem/Stromal Cell Function**. Stem Cell Research and Therapy, 2016. v. 7. p. 125

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M. & JAGGY, A. **Neurological Manifestations of Canine Distemper Virus Infection**. J. Small Anim. Pract., v. 33, p. 466-470, 1992.

TORRES, B. B. J.; RIBEIRO, V. M. **Cinomose Nervosa: patogenia, diagnóstico, tratamento e prevenção**. Revista Cães e Gatos, 2012. Edição 161. P. 18-24.

VANDEVELDE, M. & ZURBRIGGEN, A. **Demyelination in canine distemper vírus infection: A review**. Acta Neuropathol., v. 109, p. 56-68, 2005.

ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 6 e.d. Elsevier, 2018. p. 225-226

ZUK, P. A, ET.AL. . **Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells**. Molecular Biology of The Cell, 2002. V.13, n.12. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105